

QuantiFERON[®]-TB Gold

(metodo in provetta)

**Il test IFN-gamma su sangue intero
per la misurazione delle risposte agli antigeni peptidici ESAT-6, CFP-10 e
TB7.7 (p. 4)**

FOGLIETTO
ILLUSTRATIVO

Per uso diagnostico *in vitro*

cellestis

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. FINALITÀ D'USO | 2 |
| 2. RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST | 2 |
| Principi del test | 3 |
| Durata del test | 3 |
| 3. REAGENTI E CONSERVAZIONE | 4 |
| Materiali necessari (ma non forniti in dotazione) | 4 |
| Istruzioni per la conservazione | 5 |
| Provette per il prelievo del sangue | 5 |
| Reagenti del kit | 5 |
| Reagenti ricostituiti e inutilizzati | 5 |
| 4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI | 6 |
| Avvertenze | 6 |
| Precauzioni | 6 |
| 5. PRELIEVO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI | 8 |
| 6. ISTRUZIONI PER L'USO | 10 |
| FASE UNO - Incubazione del sangue e prelievo del plasma | 10 |
| FASE DUE - IFN- γ umano ELISA | 11 |
| 7. CALCOLI E INTERPRETAZIONE DEL TEST | 14 |
| Generazione della curva standard | 14 |
| Controllo di qualità del test | 15 |
| Interpretazione dei risultati | 16 |
| 8. LIMITI DEL METODO | 20 |
| 9. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE | 20 |
| 10. INFORMAZIONI TECNICHE | 22 |
| Risultati indeterminati | 22 |
| Campioni di plasma coagulato | 22 |
| Risoluzione dei problemi del test ELISA | 23 |
| Sviluppo di colorazione aspecifica | 23 |
| Valori di lettura di densità ottica bassi per gli standard | 23 |
| Background elevato | 24 |
| Curva standard non lineare e variabilità dei duplicati | 24 |
| 11. BIBLIOGRAFIA | 25 |
| 12. ASSISTENZA TECNICA | 26 |
| 13. PROCEDURA DEL TEST (IN SINTESI) | 27 |

1. FINALITÀ D'USO

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) è un test diagnostico *in vitro* che utilizza un cocktail peptidico che simula le proteine ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4), per stimolare le cellule del sangue intero eparinizzato. La rilevazione dell'interferone- γ (IFN- γ) mediante il dosaggio immunoenzimatico ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) consente di identificare le risposte *in vitro* agli agenti peptidici associati all'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*.

QuantiFERON®-TB Gold IT è un test indiretto per la rilevazione dell'infezione da *M. tuberculosis* (inclusa la malattia attiva) ed è previsto per l'uso congiuntamente alla valutazione dei rischi, agli accertamenti radiologici e ad altre valutazioni mediche e diagnostiche.

2. RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La tubercolosi è una malattia contagiosa causata dall'infezione dagli organismi del *M. tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), che in genere si trasmette attraverso le particelle aerosoliche veicolate per via aerogena da pazienti colpiti da tubercolosi respiratoria. Un individuo con infezione recente si può ammalare di tubercolosi nell'arco di alcune settimane o mesi, anche se la maggior parte dei soggetti contagiati non manifesta alcuna sintomatologia. L'infezione tubercolare latente (LTBI), una condizione asintomatica non trasmissibile, è presente in alcuni soggetti, che possono poi sviluppare la tubercolosi a mesi o anni di distanza. Scopo principale della diagnosi della LTBI è individuare un trattamento medico idoneo a prevenire la malattia tubercolare conclamata. Fino a poco tempo fa, il test cutaneo alla tubercolina (TST) era l'unico metodo disponibile per la diagnosi della LTBI. La sensibilità cutanea alla tubercolina si manifesta da 2 a 10 settimane dall'infezione. Tuttavia, alcuni soggetti contagiati (quali, ad esempio, individui con funzione immunitaria indebolita, ma anche persone che non presentano tale condizione) non rispondono alla tubercolina. Viceversa, vi sono soggetti non colpiti da infezione tubercolare che manifestano sensibilità alla tubercolina e risultano positivi al test TST dopo la vaccinazione con il bacillo di Calmette-Guérin (BCG), in seguito ad infezione da micobatteri diversi da quelli del complesso *M. tuberculosis*, o per altri fattori imprecisati.

Occorre distinguere la LTBI dalla tubercolosi, una malattia soggetta all'obbligo di notifica che solitamente colpisce i polmoni e il tratto respiratorio inferiore, ma può interessare anche altri sistemi di organi. La diagnosi della tubercolosi si basa sull'anamnesi e su riscontri fisici, radiologici, istologici e micobatterologici.

QuantiFERON®-TB Gold IT è un test che misura le risposte immuni cellulo-mediate (CMI) agli antigeni peptidici che simulano le proteine micobatteriche. Tali proteine - ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 (p4) - sono assenti in tutti i ceppi di BCG e nella maggior parte dei micobatteri non tubercolari, ad eccezione di *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*.¹ In genere, il sangue dei soggetti infetti da organismi del complesso *M. tuberculosis* contiene linfociti in grado di riconoscere questi e altri antigeni micobatterici. Il processo di riconoscimento comporta la generazione e secrezione di citochina, IFN- γ . La rilevazione e conseguente quantificazione di IFN- γ costituisce il principio del presente test.

Gli antigeni utilizzati nel test QuantiFERON®-TB Gold IT sono un cocktail peptidico che simula le proteine ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4). Numerosi studi hanno dimostrato che tali antigeni peptidici stimolano le risposte IFN- γ nelle cellule T di individui affetti da *M. tuberculosis*, ma in genere non di soggetti non infetti, o vaccinati con BCG, che non presentano malattia tubercolare o che non sono a rischio di LTBI.¹⁻³² Tuttavia, trattamenti medici o condizioni che alterano la funzionalità immunitaria possono potenzialmente ridurre le risposte IFN- γ . I pazienti affetti da altre infezioni micobatteriche possono reagire anche alle proteine ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4) poiché i geni che le codificano sono presenti in *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*.^{1,23} QuantiFERON®-TB Gold IT è sia un test per la LTBI che un ausilio utile nella diagnosi dell'infezione da *M. tuberculosis complex* in pazienti malati. Un risultato positivo avvalorava la diagnosi di malattia tubercolare, anche se le infezioni provocate da altri micobatteri (ad es. *M. kansasii*) possono anch'esse indurre positività. Per confermare o escludere la malattia tubercolare si rendono necessari altri accertamenti medici e diagnostici.

Principi del test

Il sistema QuantiFERON®-TB Gold IT prevede l'uso di provette specifiche per la raccolta di sangue intero. L'incubazione del sangue avviene nelle provette nell'arco di 16-24 ore; successivamente il plasma viene prelevato ed analizzato per rilevare la presenza di IFN- γ prodotto in risposta agli antigeni peptidici.

Il test QuantiFERON®-TB Gold IT si svolge in due fasi. Innanzi tutto il sangue intero viene raccolto in ciascuna delle provette dedicate QuantiFERON®-TB Gold, costituite da una provetta di controllo nullo, una provetta di antigene TB e una provetta opzionale per mitogeno.

La provetta del mitogeno può essere utilizzata come controllo positivo del test QuantiFERON®-TB Gold IT, in particolare nel caso in cui sussistano dubbi circa lo stato immunitario del soggetto. La provetta del mitogeno può anche essere utilizzata come controllo della corretta manipolazione e incubazione dei campioni di sangue.

Le provette vanno incubate a 37°C il più presto possibile e comunque entro 16 ore dal prelievo dei campioni. Dopo un periodo di incubazione compreso tra 16 e 24 ore, le provette sono sottoposte a centrifugazione, il plasma viene rimosso e si procede alla misurazione della quantità di IFN- γ (IU/ml) con il test ELISA.

Un test si considera positivo se la risposta IFN- γ alla provetta di antigene TB è significativamente superiore al valore nullo espresso in IU/ml di IFN- γ . Se utilizzato, il campione di plasma stimolato dal mitogeno funge da controllo positivo IFN- γ per ciascun campione analizzato. Una bassa risposta al mitogeno (<0,5 IU/ml) indica un risultato indeterminato se il campione di sangue ha avuto una risposta negativa anche agli antigeni TB. Un'eventualità di questo genere può manifestarsi in presenza di linfociti insufficienti, o di una loro ridotta attività dovuta ad un trattamento inadeguato del campione, a procedure di riempimento/miscelazione scorrette della provetta del mitogeno, o all'incapacità dei linfociti del paziente di generare IFN- γ . Il campione nullo serve a compensare gli effetti di background, degli anticorpi eterofili,⁷ o di IFN- γ non specifico nei campioni di sangue. Il livello di IFN- γ nella provetta nulla viene sottratto al livello di IFN- γ della provetta dell'antigene TB e del mitogeno (se utilizzata).

Durata del test

La stima dei tempi richiesti per effettuare il test QuantiFERON®-TB Gold IT è riportata di seguito, assieme all'indicazione del tempo necessario per l'analisi di campioni multipli in modalità batch:

| | |
|---|---|
| Incubazione a 37° C delle provette di sangue: | 16-24 ore |
| ELISA: | Circa 3 ore per ogni piastra ELISA |
| | <ul style="list-style-type: none">• <1 ora di lavoro• Aggiungere 10-15 minuti per ciascuna piastra in più |

3. REAGENTI E CONSERVAZIONE

Provette per il prelievo di sangue per l'antigene TB e l'antigene di controllo

Numero di catalogo 0590 0301

- | | |
|-------------------------------------|--------------|
| 1. Controllo nullo (tappo grigio) | 100 provette |
| 2. Antigene TB (tappo rosso) | 100 provette |
| 3. Controllo mitogeno (tappo viola) | 100 provette |

NOTA: Le provette sono disponibili anche in altre combinazioni:

*100 provette di controllo nullo, 100 provette di antigene TB
(n. cat. 0590 0201)*

100 provette di controllo mitogeno (n. cat. 0593 0201)

Provette High Altitude (fare riferimento al capitolo 5)

N. cat. 590 0501: (High Altitude) 100 provette di controllo nullo, 100 provette di antigene TB

N. cat. 0590 0505: (High Altitude) 100 provette di controllo nullo, 100 provette di antigene TB e 100 provette per mitogeno

N. cat. T0593 0501 (High Altitude) 100 provette di controllo mitogeno

Componenti per il test ELISA

Numero di catalogo 0594 0201

- | | |
|---|-----------------|
| 1. Strisce per piastre di microtitolazione | 24 x 8 pozzetti |
| 2. Standard IFN- γ umano, liofilizzato | 1 flacone |
| 3. Diluente verde (Green Diluent, GD) | 1 x 30 ml |
| 4. Coniugato concentrato 100X, liofilizzato | 1 x 0,3 ml |
| 5. Tampone di lavaggio concentrato 20X | 1 x 100 ml |
| 6. Soluzione di substrato enzimatico | 1 x 30 ml |
| 7. Soluzione di arresto enzimatico | 1 x 15 ml |

Materiali necessari (ma non forniti in dotazione)

- Incubatore a 37°C. CO₂ non richiesta.
- Pipette calibrate a volume variabile (da 10 µl a 1000 µl) con puntali monouso
- Pipetta calibrata multicanale per la dispensazione di volumi di 50 µl e 100 µl con puntali monouso
- Agitatore per micropiastre
- Acqua distillata o deionizzata – 2 litri
- Stazione di lavaggio per micropiastre (si consiglia un dispositivo di lavaggio automatico)
- Lettore per micropiastre dotato di filtro da 450 nm e di filtro di riferimento da 620 nm a 650 nm

Istruzioni per la conservazione

Provette per il prelievo del sangue

- Conservare le provette per il prelievo del sangue ad una temperatura compresa tra 4°C e 25°C.
- Se conservate a 4-25°C, le provette per il prelievo del sangue QuantiFERON®-TB Gold si mantengono stabili fino a 15 mesi dalla data di produzione.

Reagenti del kit

- Conservare il kit refrigerato ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.
- Conservare sempre la soluzione di substrato enzimatico al riparo dalla luce diretta.
- Se conservato a 2-8°C, il kit ELISA QuantiFERON®-TB Gold si mantiene stabile fino a 3 anni dalla data di produzione.

Reagenti ricostituiti e inutilizzati

Per istruzioni relative alla ricostituzione dei reagenti, fare riferimento al capitolo 6 (pagina 11).

- Se conservato a 2-8°C, lo standard ricostituito del kit si mantiene stabile fino a 3 mesi.
 - *Prendere nota della data in cui è stato ricostituito lo standard del kit.*
- Una volta ricostituito, il coniugato concentrato 100X non utilizzato va riportato alla temperatura di conservazione compresa tra 2°C e 8°C e deve essere utilizzato entro 3 mesi.
 - *Prendere nota della data in cui è stato ricostituito il coniugato.*
- Il coniugato pronto per l'uso deve essere utilizzato entro 6 ore dalla preparazione.
- Il tampone di lavaggio pronto per l'uso può essere conservato a temperatura ambiente per un massimo di 2 settimane.

4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Avvertenze

- Un risultato negativo al test QuantiFERON®-TB Gold IT non esclude la possibilità di infezione da *M. tuberculosis* o di malattia tubercolare: i risultati falsi negativi possono essere dovuti allo stadio dell'infezione (ad es. un campione prelevato prima dello sviluppo della risposta immuno-cellulare), a condizioni di comorbidità che alterano le funzioni immunitarie, alla manipolazione scorretta delle provette di raccolta del sangue dopo la venopuntura, all'esecuzione non corretta del test o ad altre variabili immunologiche.
- Un risultato positivo al test QuantiFERON®-TB Gold IT non può costituire il riscontro unico o definitivo per la diagnosi dell'infezione da *M. tuberculosis*. L'esecuzione scorretta del test può dare luogo a risultati falsi positivi.
- Un risultato positivo al test QuantiFERON®-TB Gold IT deve essere confermato da ulteriori indagini mediche e diagnostiche atte ad individuare la presenza di malattia tubercolare attiva (ad es. striscio e coltura AFB , radiografia del torace).
- Anche se gli antigeni ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4) sono assenti da tutti i ceppi BCG e dalla maggior parte dei micobatteri non tubercolari conosciuti, è possibile che un risultato positivo al test QuantiFERON®-TB Gold IT sia dovuto ad infezione da *M. kansasii*, *M. szulgai* o *M. marinum*. Se si sospetta la presenza di tali infezioni, valutare la possibilità di eseguire test alternativi.

Precauzioni

- **Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.**
- **Nocivo:** la **soluzione di substrato enzimatico** contiene 3,3',5,5' tetrametilbenzidina che è nociva per ingestione, per inalazione e a contatto con la pelle. Irritante per gli occhi e la pelle. Mutageno. Proteggersi gli occhi, indossare guanti e manipolare come un potenziale cancerogeno.
- **Nocivo:** la **soluzione di arresto enzimatico** contiene H₂SO₄ che è nocivo per ingestione, a contatto con gli occhi, a contatto con la pelle e per inalazione. Proteggersi gli occhi, indossare guanti e il normale abbigliamento protettivo da laboratorio. Qualora la soluzione di arresto entri in contatto con la cute o con gli occhi, sciacquare abbondantemente con acqua e consultare il medico.
- **Nocivo:** lo **standard IFN- γ** e il **coniugato concentrato 100X** possono provocare disturbi in caso di ingestione e causare irritazioni della cute. Indossare i guanti e normali indumenti protettivi da laboratorio.
- **Manipolare il sangue umano come se fosse potenzialmente infettivo.** Osservare le linee guida previste per la manipolazione del sangue.
- Il **timerosal** viene utilizzato come conservante in alcuni reagenti. Può risultare tossico in caso di ingestione, inalazione o a contatto con la pelle.
- Il **diluyente verde (GD)** contiene siero normale di topo e caseina, che possono provocare reazioni allergiche; evitare il contatto con la cute.
- La mancata osservanza delle istruzioni riportate nel foglietto illustrativo può portare a risultati errati. Leggere attentamente le istruzioni prima dell'uso.
- Non utilizzare il kit se un flacone di reagente è danneggiato o non perfettamente sigillato prima dell'uso.
- Non miscelare o utilizzare i reagenti ELISA appartenenti ad altri lotti del kit QuantiFERON®-TB Gold.

- Smaltire i reagenti non utilizzati e i campioni biologici nel rispetto dei regolamenti locali e nazionali vigenti in materia.
- Non utilizzare le provette per il prelievo del sangue o il kit ELISA oltre la data di scadenza.

5. PRELIEVO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

QuantiFERON®-TB Gold IT contiene le seguenti provette per il prelievo dei campioni:

1. controllo nullo (tappo grigio con anello bianco) (utilizzare tra il livello del mare e 810 m)
2. antigene TB (tappo rosso con anello bianco) (utilizzare tra il livello del mare e 810 m)
3. controllo mitogeno – facoltativo (tappo viola con anello bianco) (utilizzare tra il livello del mare e 810 m)

4. controllo nullo (tappo grigio con anello giallo) (utilizzare tra 1.020 m e 1.875 m)
5. antigene TB (tappo rosso con anello giallo) (utilizzare tra 1.020 m e 1.875 m)
6. controllo mitogeno – facoltativo (tappo viola con anello giallo) (utilizzare tra 1.020 m e 1.875 m)

Gli antigeni aderiscono alle pareti interne delle provette per il prelievo del sangue. Di conseguenza, è fondamentale miscelare completamente il contenuto delle provette con i campioni di sangue. Le provette devono essere trasferite in un incubatore a 37°C il più presto possibile e comunque entro 16 ore dal prelievo dei campioni.

Per ottenere risultati ottimali è opportuno attenersi alle seguenti procedure:

1. Per ciascun soggetto in esame prelevare 1 ml di sangue per venopuntura direttamente in ognuna delle provette dedicate QuantiFERON®-TB Gold IT.
 - Ad altitudini di 810 metri utilizzare le provette per la raccolta del sangue QuantiFERON® standard. Ad altitudini superiori ai 1.020 metri utilizzare le provette per la raccolta del sangue QuantiFERON® High Altitude (HA).

Se le provette per la raccolta del sangue QuantiFERON® vengono utilizzate ad altitudini che non rientrano in quelle sopra indicate, o se il volume di sangue raccolto è insufficiente, prelevare il sangue con una siringa e trasferirne 1 ml in ciascuna delle tre provette. Per motivi di sicurezza, la procedura migliore da seguire in questo caso consiste nel togliere l'ago della siringa e, rispettando le adeguate regole di sicurezza, togliere i tappi dalle tre provette QFT-Gold IT e aggiungere 1 ml di sangue in ciascuna (fino a raggiungere la tacca nera sul lato dell'etichetta della provetta). Richiudere per bene le provette con i tappi e miscelare seguendo le istruzioni riportate di seguito.

- Dato che nelle provette da 1 ml il sangue fluisce con relativa lentezza, mantenere la provetta sull'ago per altri 2-3 secondi dopo che sembra riempita completamente, per accertarsi di aver prelevato il volume corretto.

La tacca nera sul lato delle provette indica il volume di riempimento di 1 ml. Le provette per il prelievo del sangue QuantiFERON®-TB Gold sono state validate per volumi che variano da 0,8 a 1,2 ml. Se il livello di sangue in una qualunque delle provette non raggiunge la linea indicata, si consiglia di prelevare un altro campione di sangue.

- Se per il prelievo del sangue si utilizza un ago a farfalla, è opportuno verificare con una provetta vuota che il tubo si sia riempito di sangue, prima di usare le provette QuantiFERON®-TB Gold.
2. Miscelare il contenuto delle provette **scuotendole energicamente per 5 secondi** (o 10 volte) per assicurarsi che **l'intera superficie interna della provetta** sia ricoperta di sangue.
 - È fondamentale agitare accuratamente per garantire che il campione di sangue si mescoli completamente al contenuto della provetta.
 - L'agitazione del campione può portare alla formazione di schiuma. Tale fenomeno non pregiudica, tuttavia, le prestazioni del test e non deve costituire motivo di preoccupazione per il flebotomista.

3. Etichettare correttamente le provette.
4. Le provette devono essere trasferite in un incubatore a 37°C il prima possibile e comunque entro 16 ore dal prelievo dei campioni. Non refrigerare né congelare i campioni di sangue.

6. ISTRUZIONI PER L'USO

FASE UNO – Incubazione del sangue e prelievo del plasma

Materiali forniti

Provette per prelievo del sangue QuantiFERON[®]-TB Gold IT (consultare il capitolo 3).

Materiali necessari (ma non forniti in dotazione)

Consultare il capitolo 3.

Procedura

1. Se i campioni di sangue non vengono incubati immediatamente dopo il prelievo, **le provette devono essere nuovamente miscelate immediatamente prima dell'incubazione**, come descritto nel capitolo 5.
2. Incubare le provette **IN POSIZIONE VERTICALE** a 37°C per 16-24 ore. L'incubatore non richiede CO₂ né umidificazione.
3. Le provette per il prelievo del sangue possono essere conservate ad una temperatura compresa tra 2°C e 27°C per un massimo di 3 giorni prima della centrifugazione.
4. Dopo aver incubato le provette a 37°C, centrifugarle per 15 minuti a 2000-3000 x g (RCF) onde facilitare il prelievo di plasma. Il plug di gel separerà le cellule dal plasma. In caso contrario, centrifugare di nuovo le provette ad una velocità più elevata.
 - È possibile prelevare il plasma senza centrifugazione, anche se occorre prestare maggior attenzione durante la rimozione del plasma, per non distruggere le cellule.
5. I campioni di plasma possono essere caricati direttamente dalle provette di prelievo alla piastra ELISA QuantiFERON[®]-TB Gold, in particolare quanto si utilizzano stazioni di lavoro ELISA automatizzate.
6. In alternativa, i campioni di plasma possono essere conservati prima del test ELISA nelle provette centrifugate, oppure raccolti in contenitori per la conservazione del plasma. Ad esempio, >150 µl di plasma possono essere raccolti nei pozzetti delle micropiastre oppure in microprovette su rack in formato da 96 pozzetti e sigillati per evitare la fuoriuscita di schizzi e l'evaporazione qualora i campioni debbano essere conservati.
 - I campioni di plasma possono essere conservati per un massimo di 4 settimane a 2-8°C, o a temperature inferiori ai -20°C (possibilmente inferiori ai -70°C) per lunghi periodi.

FASE DUE – IFN- γ umano ELISA

Materiali forniti

Kit ELISA QuantiFERON[®]-TB Gold (consultare il capitolo 3).

Materiali necessari (ma non forniti in dotazione)

Consultare il capitolo 3.

Procedura

1. Tutti i campioni di plasma e i reagenti, tranne il coniugato concentrato 100X, devono essere portati a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) prima dell'uso. Farli equilibrare per almeno 60 minuti.
2. Togliere le strisce non necessarie dal supporto, sigillare di nuovo il sacchetto di alluminio e conservare in frigorifero fino a nuovo uso.

Calcolare almeno una striscia per gli standard QuantiFERON[®]-TB Gold e un numero di strisce sufficienti per il numero di soggetti da sottoporre a test (v. figure 2A e 2B, rispettivamente per i formati a 2 e 3 provette). Dopo l'uso, conservare il supporto e il coperchio per utilizzarli con le strisce rimanenti.

3. Ricostituire lo standard liofilizzato del kit con il volume di acqua distillata o deionizzata indicato sull'etichetta del flacone standard. Miscelare delicatamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma e garantire la completa solubilizzazione. La ricostituzione dello standard al volume indicato produce una soluzione con una concentrazione di 8,0 IU/ml.

Nota: il volume di ricostituzione dello standard del kit varia da lotto a lotto.

Utilizzare lo standard ricostituito del kit per produrre una serie di diluizioni 1:4 di IFN- γ in diluente verde (Green Diluent, GD) - v. figura 1. S1 (Standard 1) contiene 4 IU/ml, S2 (Standard 2) contiene 1 IU/ml, S3 (Standard 3) contiene 0,25 IU/ml e S4 (Standard 4) contiene 0 IU/ml (solo GD). Gli standard vanno analizzati almeno in duplicato.

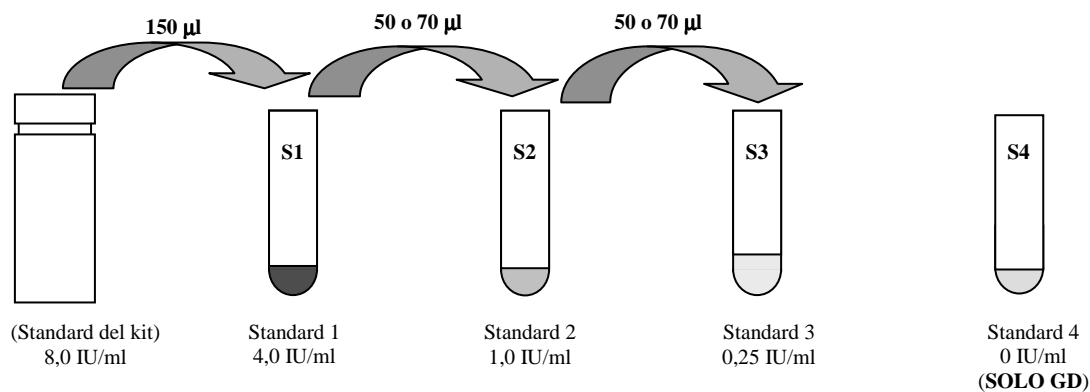
PROCEDURA RACCOMANDATA PER STANDARD IN DUPLICATO

- a. Etichettare 4 provette con "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Aggiungere **150 μl** di GD a S1, S2, S3, S4.
- c. Aggiungere **150 μl** dello standard del kit a S1 e miscelare accuratamente.
- d. Trasferire **50 μl** da S1 a S2 e miscelare accuratamente.
- e. Trasferire **50 μl** da S2 a S3 e miscelare accuratamente.
- f. **Solo GD** funge da standard zero (S4).

PROCEDURA RACCOMANDATA PER STANDARD IN TRIPLICATO

- a. Etichettare 4 provette con "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Aggiungere **150 μl** di GD a S1.
- c. Aggiungere **210 μl** di GD a S2, S3, S4.
- d. Aggiungere **150 μl** dello standard del kit a S1 e miscelare accuratamente.
- e. Trasferire **70 μl** da S1 a S2 e miscelare accuratamente.
- f. Trasferire **70 μl** da S2 a S3 e miscelare accuratamente.
- g. **Solo GD** funge da standard zero (S4).

FIGURA 1: Preparazione della curva standard



- Preparare nuove diluizioni dello standard del kit per ciascuna sessione ELISA.

4. Ricostituire il coniugato concentrato 100x liofilizzato con 0,3 ml di acqua distillata o deionizzata. Miscelare delicatamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma e garantire la completa solubilizzazione del coniugato.

Il coniugato pronto per l'uso viene preparato diluendo il volume richiesto di coniugato concentrato 100X ricostituito con diluente verde (GD), come mostrato nella sottostante Tabella 1: Preparazione del coniugato.

TABELLA 1: Preparazione del coniugato

| NUMERO DI STRISCE | VOLUME DI CONIUGATO CONCENTRATO 100X | VOLUME DI DILUENTE VERDE (GD) |
|-------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| 2 | 10 µl | 1,0 ml |
| 3 | 15 µl | 1,5 ml |
| 4 | 20 µl | 2,0 ml |
| 5 | 25 µl | 2,5 ml |
| 6 | 30 µl | 3,0 ml |
| 7 | 35 µl | 3,5 ml |
| 8 | 40 µl | 4,0 ml |
| 9 | 45 µl | 4,5 ml |
| 10 | 50 µl | 5,0 ml |
| 11 | 55 µl | 5,5 ml |
| 12 | 60 µl | 6,0 ml |

- Miscelare accuratamente, ma con delicatezza per evitare la formazione di schiuma.
 - Riportare il coniugato concentrato 100X non utilizzato ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C subito dopo l'uso.
 - Utilizzare esclusivamente diluente verde (GD).
5. Prima del test, il plasma deve essere miscelato per assicurare una distribuzione uniforme di IFN- γ nel campione.
 6. Aggiungere 50 µl di coniugato pronto per l'uso appena preparato nei relativi pozzetti ELISA con l'ausilio di una pipetta multicanale.

7. Aggiungere 50 µl dei campioni di plasma in esame nei relativi pozzetti con l'ausilio di una pipetta multicanale (per la configurazione raccomandata della piastra, consultare le figure 2A e 2B di seguito). Infine, aggiungere 50 µl in ciascuno degli Standard da 1 a 4.

FIGURA 2A: Configurazione raccomandata per le provette di controllo nullo e di antigene TB (44 test per piastra)

| FILA | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | 1N | 5N | 9N | 13N | 17N | S1 | S1 | 25N | 29N | 33N | 37N | 41N |
| B | 1A | 5A | 9A | 13A | 17A | S2 | S2 | 25A | 29A | 33A | 37A | 41A |
| C | 2N | 6N | 10N | 14N | 18N | S3 | S3 | 26N | 30N | 34N | 38N | 42N |
| D | 2A | 6A | 10A | 14A | 18A | S4 | S4 | 26A | 31A | 34A | 38A | 42A |
| E | 3N | 7N | 11N | 15N | 19N | 21N | 23N | 27N | 32N | 35N | 39N | 43N |
| F | 3A | 7A | 11A | 15A | 19A | 21A | 23A | 27A | 32A | 35A | 39A | 43A |
| G | 4N | 8N | 12N | 16N | 20N | 22N | 24N | 28N | 33N | 36N | 40N | 44N |
| H | 4A | 8A | 12A | 16A | 20A | 22A | 24A | 28A | 33A | 36A | 40A | 44A |

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Campione 1. Plasma controllo nullo); 1A (Campione 1. Plasma antigene TB).

FIGURA 2B: Configurazione raccomandata per le provette di controllo nullo, antigene TB e mitogeno (28 test per piastra)

| FILA | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | 1N | 1A | 1M | S1 | S1 | S1 | 13N | 13A | 13M | 21N | 21A | 21M |
| B | 2N | 2A | 2M | S2 | S2 | S2 | 14N | 14A | 14M | 22N | 22A | 22M |
| C | 3N | 3A | 3M | S3 | S3 | S3 | 15N | 15A | 15M | 23N | 23A | 23M |
| D | 4N | 4A | 4M | S4 | S4 | S4 | 16N | 16A | 16M | 24N | 24A | 24M |
| E | 5N | 5A | 5M | 9N | 9A | 9M | 17N | 17A | 17M | 25N | 25A | 25M |
| F | 6N | 6A | 6M | 10N | 10A | 10M | 18N | 18A | 18M | 26N | 26A | 26M |
| G | 7N | 7A | 7M | 11N | 11A | 11M | 19N | 19A | 19M | 27N | 27A | 27M |
| H | 8N | 8A | 8M | 12N | 12A | 12M | 20N | 20A | 20M | 28N | 28A | 28M |

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Campione 1. Plasma controllo nullo); 1A (Campione 1. Plasma antigene TB); 1M (Campione 1. Plasma controllo mitogeno).

8. Miscelare accuratamente il coniugato e i campioni di plasma/gli standard utilizzando un agitatore per micropiastre per 1 minuto.
9. Coprire ogni piastra con un coperchio e incubare a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) per 120 ± 5 minuti.
- Non esporre le piastre alla luce diretta durante l'incubazione.
10. Durante l'incubazione, diluire una parte di tampone di lavaggio concentrato 20X con 19 parti di acqua distillata o deionizzata e miscelare con cura. La quantità di tampone di lavaggio concentrato 20X fornita è sufficiente a preparare 2 litri di tampone di lavaggio pronto per l'uso.

Lavare i pozzetti con **400 µl** di tampone di lavaggio pronto per l'uso per almeno 6 cicli. Si consiglia di utilizzare un sistema di lavaggio per piastre automatizzato.

- Per garantire il funzionamento corretto del test è essenziale risciacquare completamente. Prima di ogni ciclo di lavaggio, verificare che ogni pozzetto sia **riempito completamente** di tampone di lavaggio fino al bordo. Si raccomanda un tempo di riposo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro.
- Aggiungere un comune disinfettante da laboratorio al serbatoio di scarico e seguire le procedure previste per la decontaminazione del materiale potenzialmente infetto.

11. Dopo averle capovolte, percuotere le piastre su un panno assorbente per rimuovere i residui di tampone di lavaggio. Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato enzimatico in ogni pozzetto e miscelare completamente utilizzando un agitatore per micropiastre.
12. Coprire ogni piastra con un coperchio e incubare a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) per 30 minuti.
 - Non esporre le piastre alla luce diretta durante l'incubazione.
13. Dopo 30 minuti di incubazione, aggiungere 50 µl di soluzione di arresto enzimatico in ciascun pozzetto e miscelare.
 - Aggiungere la soluzione di arresto enzimatico nei pozzetti nello stesso ordine e approssimativamente alla stessa velocità del substrato della fase 11.
14. Misurare la densità ottica (OD) di ogni pozzetto entro 5 minuti dall'arresto della reazione con l'ausilio di un lettore per micropiastre, dotato di un filtro da 450 nm e di un filtro di riferimento da 620 nm a 650 nm. I valori OD sono utilizzati per calcolare i risultati.

7. CALCOLI E INTERPRETAZIONE DEL TEST

Cellestis ha sviluppato il software di analisi QuantiFERON[®]-TB Gold IT per l'analisi dei dati grezzi e il calcolo dei risultati.

Il software effettua una verifica del controllo di qualità del test, genera una curva standard e fornisce un risultato per ogni soggetto sottoposto al test, come descritto nel dettaglio nell'Interpretazione della sezione Risultati.

Il metodo seguente rappresenta un'alternativa all'impiego del software di analisi QuantiFERON[®]-TB Gold IT, per il calcolo dei risultati:

Generazione della curva standard

(qualora non si utilizzi il software di analisi QuantiFERON[®]-TB Gold)

Determinare i valori medi OD dei replicati dello standard del kit su ciascuna piastra.

Costruire una curva standard $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ tracciando il $\log_{(e)}$ della media OD (asse y) rispetto al $\log_{(e)}$ della concentrazione di IFN- γ degli standard espressa in IU/ml (asse x), omettendo dai calcoli in questione lo standard zero. Calcolare la retta con il miglior fittaggio per la curva standard mediante l'analisi di regressione.

Utilizzare la curva standard per determinare la concentrazione di IFN- γ (IU/ml) di ciascuno dei campioni di plasma in esame, utilizzando il valore OD di ciascun campione.

Per questi calcoli si possono utilizzare i pacchetti software forniti con i lettori per micropiastre e i normali fogli di calcolo o software statistici (come ad esempio Microsoft Excel). Si consiglia l'uso di questi pacchetti per calcolare l'analisi di regressione, il coefficiente di variazione (CV%) degli standard, nonché il coefficiente di correlazione (r) della curva standard.

Controllo di qualità del test

L'accuratezza dei risultati analitici dipende dalla generazione di una curva standard accurata. Pertanto, i risultati ottenuti dagli standard devono essere esaminati prima di poter procedere all'interpretazione dei risultati dei campioni in esame.

Affinché il test ELISA sia valido, devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- **Il valore medio OD dello Standard 1 deve essere $\geq 0,600$.**
- **Il CV% dei valori OD replicati dello Standard 1 e Standard 2 deve essere $\leq 15\%$.**
- **I valori OD replicati dello Standard 3 e Standard 4 non devono discostarsi di più di 0,040 unità OD dalla relativa media.**
- **Il coefficiente di correlazione (r) calcolato sulla base dei valori medi di assorbanza degli standard deve essere $\geq 0,98$.**

Il software di analisi QuantiFERON[®]-TB Gold calcola e riporta questi parametri del controllo di qualità.

Qualora i criteri summenzionati non vengano soddisfatti, il test non è valido e deve essere ripetuto.

- **Il valore medio OD dello Standard zero (diluente verde, GD) deve essere $\leq 0,150$. Se il valore medio OD è $> 0,150$ occorrerà verificare la procedura di lavaggio delle piastre.**

Interpretazione dei risultati

I risultati del test QuantiFERON®-TB Gold IT vanno interpretati sulla base dei seguenti criteri:

NOTA: La diagnosi, o l'esclusione della tubercolosi, nonché la valutazione della probabilità della LTBI, richiedono una combinazione di referti epidemiologici, anamnestici, medici e diagnostici di cui si deve tenere conto per l'interpretazione dei risultati del test QuantiFERON®-TB Gold IT.

QUANDO SI UTILIZZANO SOLTANTO LE PROVETTE DI CONTROLLO NULLO E ANTIGENE TB

| Controllo nullo [IU/ml] | Antigene TB meno controllo nullo [IU/ml] | QuantiFERON®-TB [IU/ml] | Rapporto/Interpretazione |
|--|---|------------------------------------|---|
| ≤ 8,0 | < 0,35 | Negativo | Infezione da <i>M. tuberculosis</i> IMPROBABILE |
| | ≥ 0,35 e < 25% del valore del controllo nullo | | |
| | ≥ 0,35 e ≥ 25% del valore del controllo nullo | Positivo¹ | Infezione da <i>M. tuberculosis</i> probabile |
| > 8,0 ² | Qualsiasi | Indeterminato³ | I risultati sono indeterminati per quanto attiene alla risposta all'antigene TB |

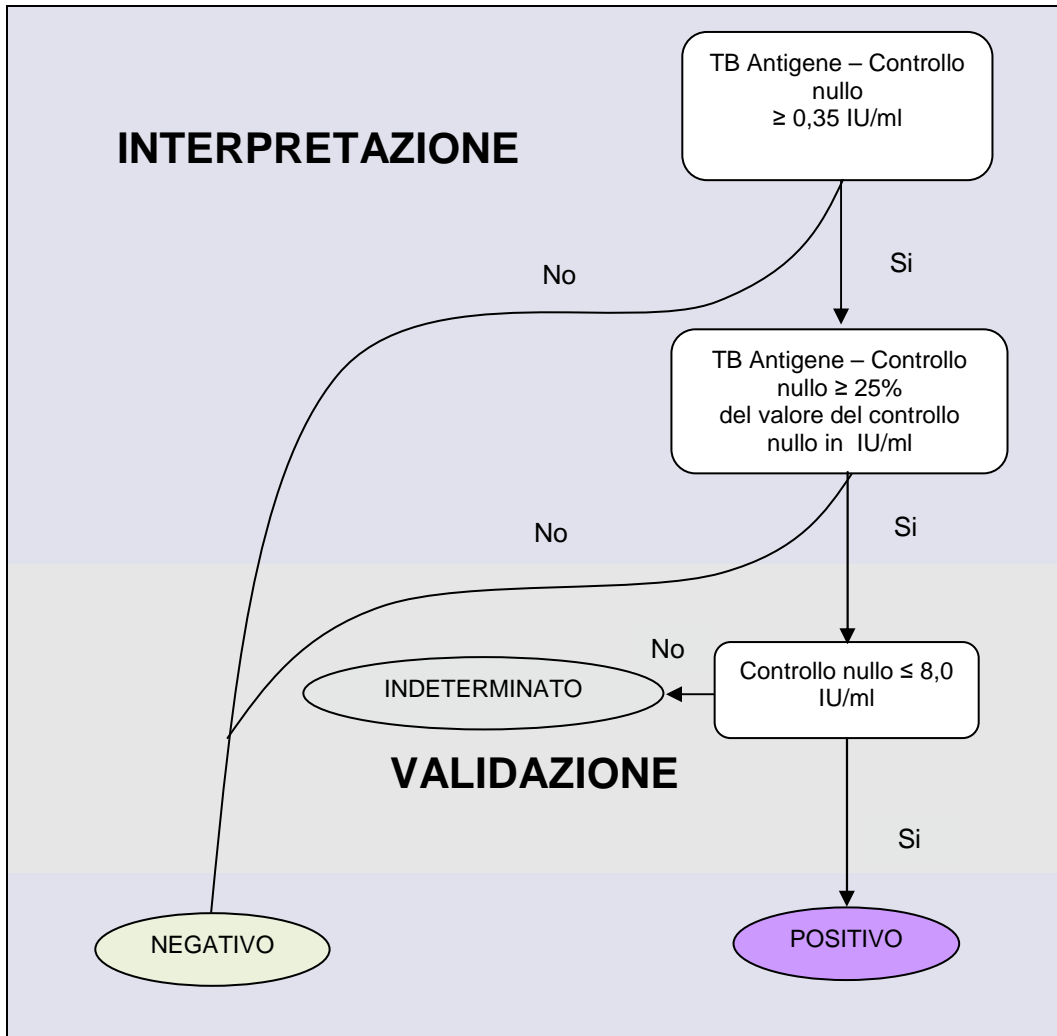
¹ Laddove non si sospetti un'infezione da *M. tuberculosis*, i risultati inizialmente positivi possono essere confermati rianalizzando in duplicato i campioni di plasma originali con il test ELISA QuantiFERON®-TB Gold. Se alla ripetizione del test uno o entrambi i replicati risultano positivi, il soggetto in esame deve essere considerato positivo al test.

² Negli studi clinici, meno dello 0,25% dei soggetti ha presentato livelli di IFN-γ > 8,0 IU/ml per il controllo nullo.

³ Per individuare le possibili cause consultare il capitolo Risoluzione dei problemi.

Il livello di concentrazione di IFN-γ misurato non è correlabile con lo stadio o il grado dell'infezione, il livello di risposta immunologica o la probabilità di progressione a malattia conclamata.

FIGURA 3: INTERPRETAZIONE DEL DIAGRAMMA DI FLUSSO CON L'UTILIZZO DI PROVETTE DI CONTROLLO NULLO E ANTIGENE TB



CON L'UTILIZZO DI PROVETTE DI CONTROLLO NULLO, ANTIGENE TB E MITOGENO

| Controllo nullo [IU/ml] | Antigene TB meno controllo nullo [IU/ml] | Mitogeno meno controllo nullo [IU/ml] ¹ | QuantiFERON®-TB [IU/ml] | Rapporto/Interpretazione |
|--|--|--|-----------------------------------|---|
| ≤ 8,0 | < 0,35 | ≥ 0,5 | Negativo | Infezione da <i>M. tuberculosis</i> IMPROBABILE |
| | ≥ 0,35 e < 25% del valore del controllo nullo | ≥ 0,5 | | |
| | ≥ 0,35 e ≥ 25% del valore del controllo nullo | Qualsiasi | Positivo ² | Infezione da <i>M. tuberculosis</i> probabile |
| | < 0,35 | < 0,5 | Indeterminato ³ | I risultati sono indeterminati per quanto attiene alla risposta all'antigene TB |
| ≥ 0,35 e < 25% del valore del controllo nullo | < 0,5 | | | |
| > 8,0 ⁴ | Qualsiasi | Qualsiasi | | |

¹ Spesso le risposte al controllo positivo del mitogeno (e talvolta dell'antigene TB) risultano al di fuori del range del lettore per micropiastre. Tale fenomeno non ha alcuna ripercussione sui risultati del test.

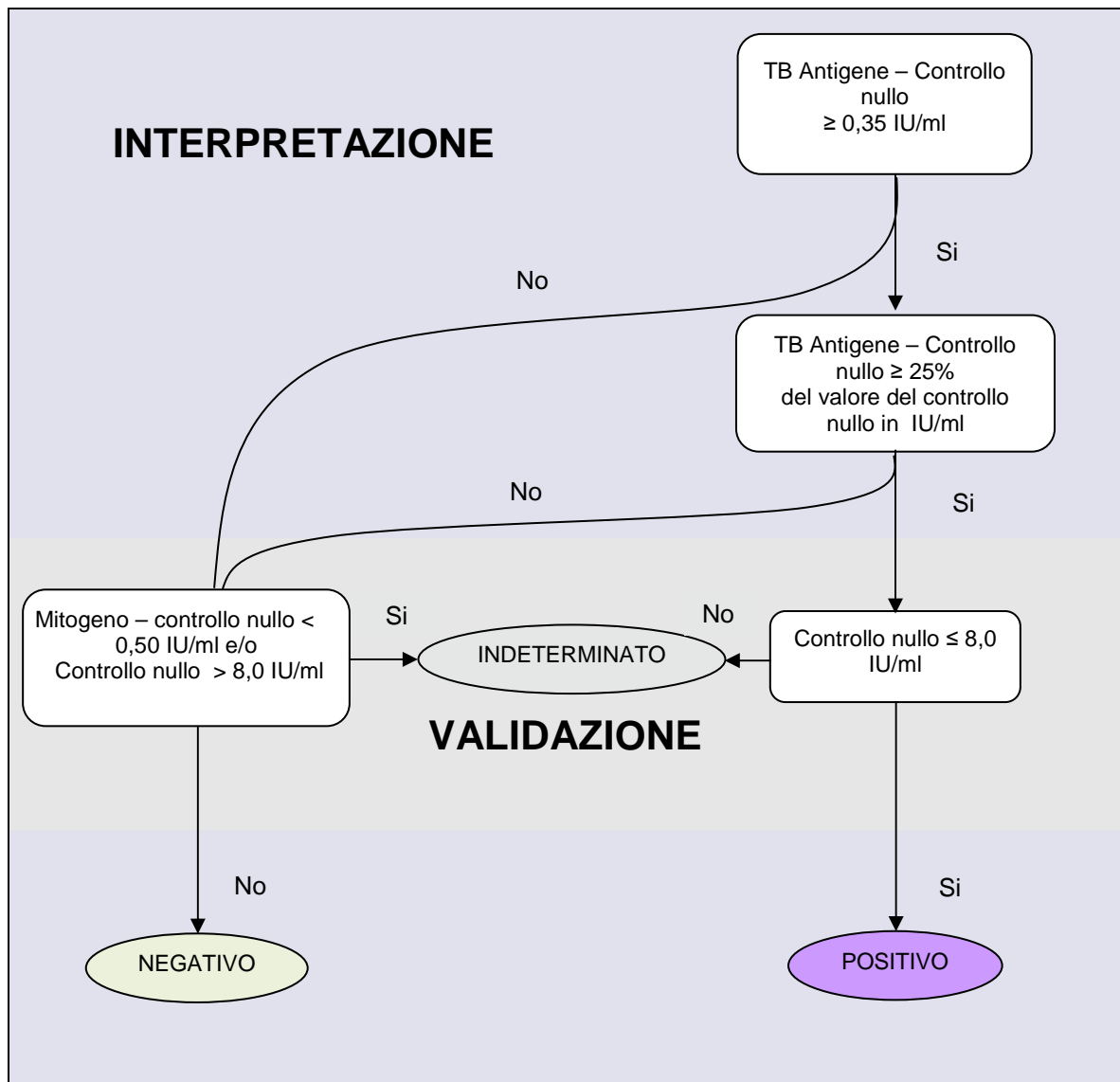
² Laddove non si sospetti un'infezione da *M. tuberculosis*, i risultati inizialmente positivi possono essere confermati rianalizzando in duplicato i campioni di plasma originali con il test ELISA QuantiFERON®-TB Gold. Se alla ripetizione del test uno o entrambi i replicati risultano positivi, il soggetto in esame deve essere considerato positivo al test.

³ Per individuare le possibili cause consultare il capitolo Risoluzione dei problemi.

⁴ Negli studi clinici, meno dello 0,25% dei soggetti ha presentato livelli di IFN-γ > 8,0 IU/ml per il controllo nullo.

Il livello di concentrazione di IFN-γ misurato non è correlabile con lo stadio o il grado dell'infezione, il livello di risposta immunologica o la probabilità di progressione a malattia conclamata.

FIGURA 4: INTERPRETAZIONE DEL DIAGRAMMA DI FLUSSO CON L'UTILIZZO DI PROVETTE DI CONTROLLO NULLO, ANTIGENE TB E MITOGENO



8. LIMITI DEL METODO

I risultati del test QuantiFERON®-TB Gold IT devono essere valutati nell'ambito del quadro epidemiologico e clinico attuale di ciascun soggetto, tenendo conto anche di altre valutazioni diagnostiche.

I soggetti con valori nulli superiori a 8 IU/ml vengono classificati come "indeterminati" perché una risposta agli antigeni TB superiore al 25% può risultare al di fuori del range di misura del test.

Le cause di risultati inaffidabili o indeterminati possono essere:

- deviazioni dalla procedura descritta nel foglietto illustrativo;
- livelli eccessivi di IFN- γ in circolo o presenza di anticorpi eterofili;
- lasso di tempo superiore alle 16 ore decorso tra il prelievo del sangue e l'inizio dell'incubazione a 37°C.

9. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Studi clinici

Poiché non esiste uno standard definitivo per l'infezione tubercolare latente (LTBI), non è in pratica possibile valutare la sensibilità e la specificità di QuantiFERON®-TB Gold IT. La specificità di QuantiFERON®-TB Gold IT è stata calcolata in modo approssimato valutando i tassi di falsi positivi nei soggetti a basso rischio (nessun fattore di rischio noto) di infezione tubercolare. La sensibilità è stata calcolata in modo approssimato valutando gruppi di pazienti con malattia tubercolare attiva confermata da coltura.

Specificità

In uno studio condotto negli Stati Uniti su 866 volontari, sono stati eseguiti dei prelievi di sangue per l'analisi con QuantiFERON®-TB Gold IT ogni qualvolta era richiesto un test cutaneo alla tubercolina (TST). I dati demografici e i fattori di rischio per la TB sono stati determinati utilizzando uno studio standard al momento dell'analisi. Sono stati ottenuti risultati relativi al test QuantiFERON®-TB Gold IT e al test cutaneo alla tubercolina (TST) per 391 soggetti sui 432 volontari senza fattori di rischio noti di infezione da *M. tuberculosis*. Nessuno era stato vaccinato con BCG. Un secondo studio sulla specificità è stato eseguito con QuantiFERON®-TB Gold IT su soggetti a basso rischio in Giappone, il 90% circa dei quali era stato sottoposto a vaccinazione con BCG. I risultati dei due studi sulla specificità sono illustrati nella tabella 2.

Tabella 2. Specificità di QuantiFERON®-TB Gold IT: risultati di soggetti senza fattori di rischio riferiti di infezione da *M. tuberculosis*

| STUDIO | Stato BCG % vaccinati | Totale analizzati | N. di QFT-G indeterminati | N. di QFT-G positivi / n. test validi | Specificità di QFT-G (IC 95%) | N. di TST positivi / n. campioni analizzati | Specificità TST* (IC 95%) |
|------------------------------------|--------------------------|----------------------|------------------------------|---|-------------------------------------|--|---------------------------------|
| Stati Uniti (non pubblicato) | 0% | 391 | 1 | 3 / 390 | 99,2% (97,6-99,8) | 6 / 391 | 98,5% (96,5-99,4) |
| Giappone (non pubblicato) | ~90% | 190 | 4 | 3 / 186 | 98,4% (95-99,6) | - | - |
| TOTALE | | 581 | 5/584 (0,9%) | 6 / 576 | 99,0% | - | - |

*Utilizzando un valore di cut-off TST pari a 10 mm. La stima sulla specificità del TST è del 99,1% utilizzando un valore di cut-off pari a 15 mm.

Sensibilità alla TB attiva

I soggetti con sospetta malattia tubercolare in Australia e Giappone, per i quali è stata successivamente confermata l'infezione da *M. tuberculosis* mediante coltura, sono stati sottoposti ad analisi per valutare la sensibilità di QuantiFERON®-TB Gold IT. Sebbene non esista un test standard definitivo per l'infezione tubercolare latente (LTBI), un surrogato adeguato è la coltura microbiologica di *M. tuberculosis*, dato che i

pazienti affetti dalla malattia sono infetti per definizione. I pazienti sono stati sottoposti a meno di 8 giorni di trattamento prima del prelievo dei campioni di sangue per l'analisi con QuantiFERON®-TB Gold IT.

La tabella 3 presenta un quadro sintetico dei risultati dei due gruppi di pazienti risultati positivi alla coltura per *M. tuberculosis*. La sensibilità totale di QuantiFERON®-TB Gold IT per la malattia tubercolare attiva è risultata pari all'89% (48/54).

Tabella 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: soggetti con infezione da *M. tuberculosis* confermata da coltura

| STUDIO | | Malattia confermata attraverso | N. di QFT-Gold positivi / n. di test validi | Sensibilità di QFT-Gold (IC 95%) |
|---|-----------------|--------------------------------|---|----------------------------------|
| Studio di validazione pazienti TB giapponesi | | Coltura | 24 / 27 | 89% (72-96%) |
| Studio di validazione pazienti TB australiani | Polmonare | Coltura | 7 / 10 | 70% (40-89%) |
| | Extra-polmonare | | 17 / 17 | 100% (82-100%) |
| TOTALE | | | 48 / 54 | 89% (78-95%) |

Diagnosi di LTBI

Sono stati pubblicati diversi studi sulle prestazioni di QuantiFERON®-TB Gold IT in varie popolazioni a rischio di LTBI. I risultati principali di alcuni studi selezionati sono illustrati nella tabella 4.

Tabella 4. Studi pubblicati selezionati su QuantiFERON®-TB Gold IT in popolazioni a rischio di LTBI

| STUDIO | Totale esaminati | Risultati |
|---|------------------|---|
| Operatori sanitari indiani (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶ | 726 | Ambiente con tassi molto elevati di TB. 40% di risultati positivi con QFT-Gold IT rispetto al 41% di risultati positivi con TST a 10 mm. Elevata concordanza con TST, nessun effetto della vaccinazione BCG per entrambi i test. Entrambi i test correlati ai fattori di rischio in base all'età e al periodo di lavoro in ambiente sanitario. |
| Danesi affetti da HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵ | 590 | La prevalenza complessiva di LTBI con QFT-Gold IT è risultata del 4,6% (27/590) in soggetti HIV+. I risultati positivi erano associati al rischio di TB. Due soggetti risultati positivi al test QFT-Gold IT hanno sviluppato la malattia tubercolare attiva entro un anno. Le risposte indeterminate (n=20, 3,4%) erano associate ad una conta CD4 <100 / µl. |
| Bambini ospedalizzati (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹² | 105 | I bambini con sospetta malattia tubercolare o che hanno avuto contatti con la TB sono stati sottoposti a test con QFT-Gold IT e TST. 10,5% di risultati positivi con QFT-Gold IT rispetto al 9,5% di risultati positivi con TST a 10 mm. L'indice di concordanza tra i due test era del 95,2% complessivamente e del 100% in soggetti non sottoposti a vaccinazione con BCG. |
| Contatto con casi indice in Germania (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹ | 309 | Sono stati analizzati i soggetti a stretto contatto con 15 casi indice diversi. Il 51% era vaccinato con BCG, il 27% nato all'estero. Il 70% dei vaccinati BCG e il 18% dei non vaccinati sono risultati positivi al TST (5 mm), mentre il 9% e l'11% rispettivamente sono risultati positivi al test QFT-Gold IT. QFT-Gold IT era associato al rischio di TB, mentre il TST era unicamente associato al vaccino BCG. |

Molte altre pubblicazioni descrivono le prestazioni della versione meno sensibile di QuantiFERON®-TB Gold ad antigene liquido (precursore di QuantiFERON®-TB Gold IT) e del test QuantiFERON®-TB Gold IT. Questi studi includono l'utilizzo dei test in casi di contatto con TB attiva^{9,11, 19, 25}, bambini^{6-10, 25, 28}, soggetti HIV positivi^{2, 5, 20}, operatori sanitari^{13, 26, 32}, immunosoppressi^{3, 4, 22, 23, 27, 30, 31}, soggetti con sospetta TB^{7, 8, 10, 18} e a basso rischio¹⁵.

Ripetibilità ed effetti del TST sui successivi test con QuantiFERON®-TB Gold

Nell'ambito dello studio USA sulla specificità, un sottogruppo di volontari è stato sottoposto alla ripetizione del test 4-5 settimane dopo il primo test con QuantiFERON®-TB Gold IT e TST. 260 soggetti sono stati sottoposti alla ripetizione del test QuantiFERON®-TB Gold IT e il livello di concordanza è risultato pari al 99,6% (259/260). Il TST precedente non ha determinato risposte positive al test QuantiFERON®-TB Gold IT.

10. INFORMAZIONI TECNICHE

Risultati indeterminati

I risultati indeterminati dovrebbero essere rari e potrebbero dipendere dallo stato di immunità del soggetto in esame nonché da una serie di fattori tecnici:

- lasso di tempo superiore alle 16 ore decorso tra il prelievo del sangue e l'inizio dell'incubazione a 37°C
- conservazione del sangue al di fuori del range di temperatura raccomandato (22°C ± 5°C)
- miscelazione insufficiente delle provette per il prelievo del sangue
- lavaggio incompleto della piastra ELISA

Se si sospettano problemi tecnici relativi al prelievo o alla manipolazione dei campioni di sangue, ripetere l'intera procedura del test QuantiFERON®-TB Gold IT con un nuovo campione di sangue. È possibile ripetere il test ELISA del plasma stimolato se si sospetta un lavaggio inadeguato o altri scostamenti rispetto alla procedura prevista per il test ELISA. I risultati indeterminati dovuti a valori bassi di mitogeno o elevati nulli non dovrebbero cambiare alla ripetizione del test, salvo il caso in cui si sia verificato un errore con il test ELISA. I risultati indeterminati vanno riportati tali quali. Il medico potrà scegliere di prelevare un nuovo campione o di avvalersi eventualmente di altri metodi.

Campioni di plasma coagulato

Se nei campioni di plasma conservati per lunghi periodi si dovessero formare coaguli di fibrina, centrifugare i campioni per far sedimentare il materiale coagulato e facilitare il pipettaggio del plasma.

Risoluzione dei problemi del test ELISA

Sviluppo di colorazione aspecifica

| CAUSA POSSIBILE | SOLUZIONE |
|--|--|
| Lavaggio incompleto della piastra | Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 µl/pozzetto di tampone di lavaggio. A seconda del dispositivo di lavaggio utilizzato, potrebbero essere necessari più di 6 cicli di lavaggio. Va osservato un tempo di riposo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro. |
| Contaminazione crociata dei pozzetti ELISA | Pipettare e miscelare con cura il campione per ridurre al minimo i rischi. |
| Kit o componenti scaduti | Assicurarsi che il kit venga utilizzato entro la data di scadenza. Accertarsi che lo standard e il coniugato concentrato 100X ricostituiti vengano utilizzati entro tre mesi dalla data di ricostituzione. |
| Contaminazione della soluzione di substrato enzimatico | Eliminare il substrato in caso di colorazione blu. Accertarsi che vengano utilizzati contenitori di reagenti puliti. |

Valori di lettura di densità ottica bassi per gli standard

| CAUSA POSSIBILE | SOLUZIONE |
|--|--|
| Errore nella diluizione dello standard | Assicurarsi che le diluizioni dello standard del kit siano preparate correttamente seguendo le istruzioni riportate nel foglietto illustrativo. |
| Errore nel pipettaggio | Assicurarsi di calibrare ed utilizzare le pipette secondo le istruzioni del produttore. |
| Temperatura di incubazione troppo bassa | L'incubazione del test ELISA deve essere effettuata a temperatura ambiente, tra 17°C e 27°C. |
| Tempo di incubazione troppo breve | L'incubazione della piastra con il coniugato, gli standard e i campioni deve durare 120 ± 5 minuti. La soluzione di substrato enzimatico viene incubata sulla piastra per 30 minuti. |
| Utilizzo del filtro sbagliato per il lettore delle piastre | La piastra deve essere letta a 450 nm con un filtro di riferimento da 620 a 650 nm. |
| Reagenti troppo freddi | Tutti i reagenti, ad eccezione del coniugato concentrato 100X, devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'inizio del test. Tale operazione richiede circa un'ora. |
| Kit o componenti scaduti | Assicurarsi che il kit venga utilizzato entro la data di scadenza. Accertarsi che lo standard e il coniugato concentrato 100X ricostituiti vengano utilizzati entro tre mesi dalla data di ricostituzione. |

Background elevato

| CAUSA POSSIBILE | SOLUZIONE |
|--|--|
| Lavaggio incompleto della piastra | Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 µl/pozzetto di tampone di lavaggio. A seconda del dispositivo di lavaggio utilizzato, potrebbero essere necessari più di 6 cicli di lavaggio. Va osservato un tempo di riposo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro. |
| Temperatura di incubazione troppo alta | L'incubazione del test ELISA deve essere effettuata a temperatura ambiente, tra 17°C e 27°C. |
| Kit o componenti scaduti | Assicurarsi che il kit venga utilizzato entro la data di scadenza. Assicurarsi che lo standard e il coniugato concentrato 100X ricostituiti vengano utilizzati entro tre mesi dalla data di ricostituzione. |
| Contaminazione della soluzione di substrato enzimatico | Eliminare il substrato in caso di colorazione blu. Accertarsi che vengano utilizzati contenitori di reagenti puliti. |

Curva standard non lineare e variabilità dei duplicati

| CAUSA POSSIBILE | SOLUZIONE |
|---|--|
| Lavaggio incompleto della piastra | Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 µl/pozzetto di tampone di lavaggio. A seconda del dispositivo di lavaggio utilizzato, potrebbero essere necessari più di 6 cicli di lavaggio. Va osservato un tempo di riposo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro. |
| Errore nella diluizione dello standard | Assicurarsi che le diluizioni dello standard siano preparate correttamente seguendo le istruzioni riportate nel foglietto illustrativo. |
| Miscelazione insufficiente | Miscelare completamente i reagenti capovolgendo i rispettivi flaconi o agitandoli al Vortex delicatamente prima di aggiungerli alla piastra. |
| Tecnica di pipettaggio irregolare o interruzione durante la preparazione del test | L'aggiunta del campione e dello standard deve essere effettuata senza interruzione. Tutti i reagenti vanno preparati prima dell'inizio del test. |

Il CD-ROM con informazioni sul prodotto e una guida tecnica, che si può richiedere gratuitamente alla Cellestis o al distributore di fiducia, contiene il video della procedura del test e la soluzione alla maggior parte dei problemi tecnici.

11. BIBLIOGRAFIA

A comprehensive list of QuantiFERON[®]-TB Gold references is located on the Cellestis website (www.cellestis.com)

1. **Andersen, P., et al.** Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000. 356; 1099-104.
2. **Balcells, M.E., et al.** A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis.* 2008. 12; 645-52.
3. **Bartalesi, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J.* 2008. [Epub ahead of print].
4. **Bocchino, M., et al.** Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008. 27; 907-13.
5. **Brock, I., et al.** Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res.* 2006. 7; 56.
6. **Chun, J.K., et al.** The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008. [Epub ahead of print].
7. **Connell, T.G., et al.** A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 2008. 3; e2624.
8. **Detjen, A.K., et al.** Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2007. 45; 322-8.
9. **Diel, R., et al.** Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest.* 2008. [Epub ahead of print].
10. **Diel, R., et al.** Predictive value of a whole-blood IFN- γ assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. **Diel, R., et al.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. **Dogra, S., et al.** Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007. 54; 267-76.
13. **Drobniewski, F., et al.** Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. **Gerogianni, I., et al.** Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology.* 2008. 13; 270-4.
15. **Harada, N., et al.** Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect.* 2008. 56; 348-53.
16. **Higuchi, K., et al.** Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2008. [Epub ahead of print].
17. **Kang, Y.A., et al.** Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA.* 2005. 293; 2756-61.
18. **Katiyar, S. K., et al.** Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 1146-52.
19. **Kipfer, B., et al.** Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly.* 2008. 138; 267-72.
20. **Luetkemeyer, A., et al.** Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 175; 737-42.
21. **Mackensen, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008. 146; 761-6.

13. PROCEDURA DEL TEST (IN SINTESI)

FASE 1 – INCUBAZIONE DEL SANGUE

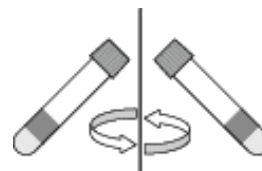
1. Raccogliere il sangue del paziente nelle provette dedicate e miscelare **agitando energicamente le provette per 5 secondi (o 10 volte)** per assicurarsi che **l'intera superficie interna della provetta** sia ricoperta di sangue.



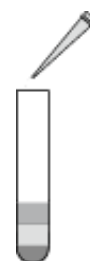
2. Incubare le provette **in posizione verticale** a 37°C per 16-24 ore.



3. Dopo l'incubazione, centrifugare le provette per 15 minuti a 2000 – 3000 x g (RCF) per separare il plasma e i globuli rossi.

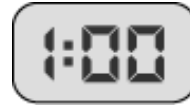


4. Dopo la centrifugazione, prelevare il campione di plasma da ciascuna provetta per la quantificazione di IFN- γ .



FASE 2 – IFN- γ ELISA

1. Equilibrare i componenti ELISA, ad eccezione del coniugato concentrato 100X, a temperatura ambiente per almeno 60 minuti.

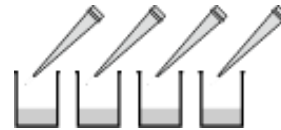


2. Ricostituire lo standard del kit a 8,0 IU/ml con acqua distillata o deionizzata. Preparare quattro (4) diluizioni standard.

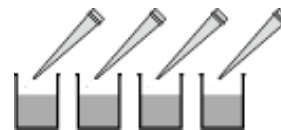


3. Ricostituire il coniugato concentrato 100X liofilizzato con acqua distillata o deionizzata.

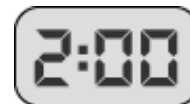
4. Preparare il coniugato pronto per l'uso con il diluente verde (GD) e aggiungere 50 μ l in tutti i pozzetti.



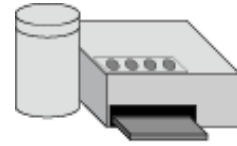
5. Aggiungere 50 μ l di campioni di plasma in esame e 50 μ l degli standard nei relativi pozzetti. Miscelare con un agitatore.



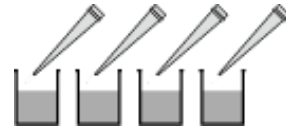
6. Incubare per 120 minuti a temperatura ambiente.



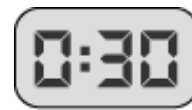
7. Lavare i pozzetti almeno 6 volte con 400 μ l/pozzetto di tampone di lavaggio.



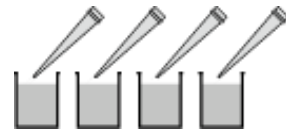
8. Aggiungere nei pozzetti 100 μ l di soluzione di substrato enzimatico. Miscelare con un agitatore.



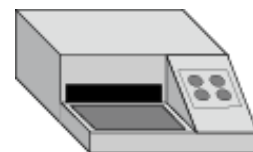
9. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.



10. Aggiungere in tutti i pozzetti 50 μ l di soluzione di arresto. Miscelare con un agitatore.



11. Leggere i risultati a 450 nm con un filtro di riferimento da 620 a 650 nm.



12. Analizzare i risultati.





Prodotto per:
Cellestis Limited (Australia) e Cellestis GmbH (Europa)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australia
Tel. (Australia) +61 3 9571 3500, (Europa) +49 6151 428 59-0
E-mail: quantiferon@cellestis.com
Sito Web: www.cellestis.com

N. doc. 05990301C
August 2009

| | |
|----|-----|
| EC | REP |
|----|-----|

Mandatario:
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover
Germany

